



IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE
(Case No. 03-1013)

1661
PATENT

In the Application of:

Wieland et al.

Serial No.: 09/597,592

Examiner: June Hwu

Filed: June 15, 2000

Art Unit: 1661

For: Procedure and Diagnostic Product for the
Determination of Triglyceride Contained in
Lipoprotein

Commissioner for Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, VA 22313-1450

TRANSMITTAL LETTER

1. We are transmitting herewith the attached papers for the above-identified patent application:

- ☒ Transmittal Letter
- ☒ Perfection of Claim of Priority (1 sheet);
- ☒ Certified Copy of Priority Document German Patent Application No. 197 56 255.8
- ☒ Return Receipt Postcard

2. With respect to Fees:

- ☒ No fee is required.

3. **GENERAL AUTHORIZATION TO CHARGE OR CREDIT FEES:** Please charge any additional fees or credit overpayment to Deposit Account No. 13-2490. A duplicate copy of sheet this sheet is enclosed.

4. **CERTIFICATE OF MAILING UNDER 37 CFR § 1.8:** The undersigned hereby certifies that this Transmittal Letter and the paper, as described in paragraph 1 hereinabove, are being deposited with the United States Postal Service with sufficient postage as first class mail in an envelope addressed to: Commissioner for Patents, P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 on this 27th day of December, 2004.

By:

Sherri L. Oslick, Ph.D.
Reg. No. 52,087



PATENT

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE
(Case No. 03-1013)

In application of:

Wieland et al.

Serial No: 09/597,592

Filed: June 16, 2000

**For: Procedure and Diagnostic Product
for the Determination of Triglyceride
Contained In Lipoprotein**

Examiner: June Hwu

Group Art Unit: 1661

Commissioner for Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, VA 22313-1450

PERFECTION OF CLAIM OF PRIORITY

Dear Sir:

Applicants enclose herewith a Certified Copy of German Patent Application 197 56 255.8, filed December 17, 1997, in support of Applicant's claim of the benefit to the right accorded by 35 U.S.C. §119 as specified in Applicant's declaration.

Respectfully submitted,
McDonnell Boehnen Hulbert & Berghoff LLP

Dated: 12-27-04

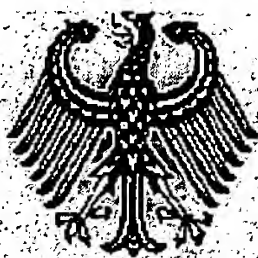
By: Sherri L. Oslick
Sherri L. Oslick, Ph.D.
Reg. No. 52,087

CERTIFICATE OF MAILING UNDER 37 C.F.R. § 1.8

I hereby certify that this correspondence is being deposited with the United States Postal Service with sufficient postage as first class mail in an envelope addressed to: Commissioner for Patents, P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313, on this day, 27 December 2004.

Sherri L. Oslick
Sherri L. Oslick

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND



Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

Aktenzeichen: 197 56 255.8

Anmeldetag: 17. Dezember 1997

Anmelder/Inhaber: Roche Diagnostics GmbH, 68305 Mannheim/DE

Erstanmelder: Professor Dr.med. Heinrich
Wieland, 79271 St Peter/DE

Bezeichnung: Verfahren und Diagnostikprodukt zur Bestimmung
von in Lipoprotein enthaltenem Triglycerid

IPC: G 01 N, C 12 Q, C 12 S

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 9. Dezember 2004
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

Agurks

Tiedtke-Bühling-Kinne, POB 20 19 18, D-80019 München



Duplikat

**Patentanwälte
Vertreter beim EPA***

Dipl.-Ing. H. Tiedtke*
Dipl.-Chem. G. Bühling*
Dipl.-Ing. R. Kinne*
Dipl.-Ing. B. Pellmann*
Dipl.-Ing. K. Grams*
Dipl.-Biol. Dr. A. Link*
Dipl.-Ing. A. Vollnhals*
Dipl.-Ing. T. Leson*
Dipl.-Ing. H. Trösch*
Dipl.-Ing. Dr. G. Chivarov*
Dipl.-Ing. M. Grill*
Dipl.-Ing. A. Kühn

**Bavariaring 4,
D-80336 München**

17. Dezember 1997

DE 20942

Prof. Dr. med. Heinrich Wieland
St. Peter, Deutschland

Verfahren und Diagnostikprodukt zur Bestimmung von in
Lipoprotein enthaltenem Triglycerid

Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren bzw. ein
5 Diagnostik-Produkt zur Bestimmung von in Lipoprotein
enthaltenem Triglycerid.

Die koronare Herzkrankheit (KHK) ist nach wie vor in den
westlichen Industrienationen die Haupttodesursache. Während
10 die Bedeutung des Cholesterins als Risikofaktor für die
koronare Herzkrankheit allgemein anerkannt ist, wird in
diesem Zusammenhang auch die Beurteilung von Protein-
assoziierten Triglyceriden, insbesondere der im Blutserum
vorliegenden Lipoproteine, in Betracht gezogen.

15

Die Aufteilung von Lipoproteinfraktionen erfolgt in der Regel
auf der Basis unterschiedlicher Dichte in Lipoproteine mit
sehr niedriger Dichte ("very low density lipoproteins", im
folgenden VLDL abgekürzt), Lipoproteine mit niedriger Dichte
20 ("low density lipoproteins", LDL) und Lipoproteine mit hoher
Dichte ("high density lipoproteins", HDL).

Eine weitere spezifizierte Lipoproteinklasse ist diejenige
der Chylomicron (CM).

Darüberhinaus können die Lipoproteine in weitere Sub-
25 fraktionen eingeteilt werden. Unter diesen besitzen besonders
die "intermediate density proteins" (IDL) und die "small
dense LDL" eine große Bedeutung für die Entstehung der KHK.
Die genannten, beiden Subfraktionen der LDL sind besonders
triglyceridreich, so daß die LDL-Triglyceride bezüglich des
30 KHK-Risikos aussagekräftiger als das etablierte LDL-
Cholesterin sind.

Für die Diagnosestellung von Gefäßerkrankungen, wie der
koronaren Herzkrankheit, der peripheren arteriellen
35 Verschlußkrankheit und mikro- bzw. makroangiopathischen
Veränderungen, ist der Triglyceridgehalt in den einzelnen
Lipoproteinfraktionen sowie die relativen Gehaltsmengen in

den Lipoproteinfraktionen untereinander von Bedeutung. Insbesondere für die LDL-Fraktion wird angenommen, daß ein hoher Triglyceridgehalt mit der koronaren Herzkrankheit assoziiert ist.

5

Herkömmliche Verfahren zur Bestimmung von in Lipoprotein enthaltenem Triglycerid beruhen im wesentlichen auf einem zweistufigen Prozeß.

10 Zunächst wird ein Fraktionierungsschritt durchgeführt, um die jeweiligen Lipoproteinfraktionen - möglichst spezifisch - aufzutrennen. Danach wird ein Schritt zur Bestimmung von Triglycerid in den dementsprechend aufgetrennten Lipoproteinfraktionen durchgeführt.

15 Für den Fraktionierungsschritt stehen unterschiedliche Methoden zur Verfügung.

Die Präzipitationsmethode ist in erster Linie auf die Bestimmung des Triglyceridgehalts in Lipoproteinen hoher Dichte (HDL) ausgelegt. Die selektive Präzipitierung von LDL-Triglyceriden ist zwar versucht worden. Jedoch hat sich die 20 reine Präzipitationsmethode als ungeeignet erwiesen, da beträchtliche Mengen an VLDL mit der LDL-Fraktion copräzipitieren, so daß eine Differenzierung des Triglyceridgehalts in den jeweiligen Lipoproteinen nur schlecht möglich ist (s. R. Siekmeier et al. in Clin. Chim. Acta 177, S. 231 (1988), R. Siekmeier et al. in Clin. Chem. 36, S. 2109-2113 (1990), und M. Nauck et al. in Klin. Lab. 40, S. 167-176 (1994)).

25 Daher wurden LDL-Triglyceride in der Praxis mittels sequentieller Ultrazentrifugation ihrer Dichte entsprechend in der Ultrazentrifuge, wobei sich die Dauer bis zum Erhalt der LDL-Fraktion auf 48 Stunden beläuft, oder durch ein verkürztes, kombiniertes Verfahren aus Ultrazentrifugation und Präzipitation bestimmt.

30 Bei der letztgenannten, relativ selektiven Auftrennung wird zunächst die VLDL-Fraktion mit der Ultrazentrifuge abgetrennt (Dauer etwa 24 h), und dann wird die verbleibende LDL-

Fraktion mehr oder weniger selektiv durch geeignete Agentien gefällt (Manual of Laboratory Operation, DHEW No. (NIH) 75-628 National Heart and Lung Institute; Lipid Research Clinics Program, Bethesda, MD, USA, S. 1-74 (1979)).

- 5 Daraufhin wird aus der Triglycerid-Konzentration vor und nach der LDL-Präzipitation die Menge an LDL-Triglyceriden rechnerisch ermittelt.

Eine weitere Fraktionierungsmethode bietet die elektro-phoretische Auftrennung der Lipoproteine in einer geeigneten
10 Trägermatrix, beispielsweise einem Agarose-Gel, wie in der DE 195 20 210 A1 beschrieben.

- 15 Allgemeine Nachteile dieser herkömmlichen Verfahren zur spezifischen Bestimmung von Triglyceriden in Lipoproteinfraktionen ergeben sich daraus, daß die Fraktionierungsschritte sowohl arbeits- als auch zeitintensiv sind. Auch lassen sich diese herkömmlichen Methoden schlecht bzw. überhaupt nicht automatisieren. Ohne einen solchen Fraktionierungsschritt ist jedoch die diagnostische Aussage auf der
20 Basis von Lipoprotein-assoziierten Triglyceriden als Risikofaktor für Gefäßkrankheiten praktisch nicht verfügbar, da erst die selektive Zuweisung des Triglyceridgehaltes zu einzelnen bzw. unterschiedlichen Lipoproteinfraktionen eine aussagekräftige Risikobeurteilung zuläßt. Sieht man insbe-
25 sondere die LDL-Triglycerid-Konzentration als besonders aussagekräftig für die Prävention der koronaren Herzkrankheiten an, so ist gerade die routinemäßige Erfassung bzw. Bestimmung der LDL-Triglyceride erwünscht.

- 30 Der Erfindung liegt deshalb die Aufgabe zugrunde, ein einfaches, schnelles und zuverlässiges Verfahren zur Bestimmung von in Lipoprotein enthaltenem Triglycerid zur Verfügung zu stellen, wobei eine möglichst gute Selektivität hinsichtlich der einzelnen Lipoproteinfraktionen, insbesondere hinsicht-
35 lich des diagnostisch besonders aussagekräftigen LDL-Triglyceridgehalts, ermöglicht wird.

Diese Aufgabe wird durch ein Verfahren zur Bestimmung von in Lipoprotein enthaltenem Triglycerid mit den folgenden Maßnahmen gelöst:

- 5 a) Umsetzen von Triglycerid-haltigem Lipoprotein mit einem nicht-ionischen oberflächenaktiven Mittel, welches aus einem Block-Copolymeren von Propylenoxid und Ethylenoxid aufgebaut ist, und
- b) Durchführen einer Triglycerid-Bestimmungsmethode.

10

Weitere Gegenstände der vorliegenden Erfindung bestehen in einem zur Durchführung dieses vorstehend genannten Verfahrens besonders angepaßten Diagnostik-Produkts gemäß Anspruch 18, sowie in der Verwendung des vorstehend genannten Verfahrens
15 bzw. des Diagnostik-Produkts zur In-vitro-Diagnose von Gefäßerkrankungen gemäß Anspruch 34.

20

Erfindungsgemäß wurde überraschend festgestellt, daß der Einsatz von aus Polypropylenoxid-Einheiten und Poly-
ethylenoxid-Einheiten aufgebauten Block-Copolymeren als ein besonderer Typ von nicht-ionischen oberflächenaktiven Mitteln eine ausgezeichnete Selektivität der Triglycerid-Bestimmung in Bezug auf eine einzige oder bestimmte Klassen von Lipoproteinfraktionen zuläßt. Eine besonders hohe Selektivität
25 durch den Einsatz der Polyoxypropylen-Polyoxyethylen-Block-Copolymeren (im folgenden POP-POE abgekürzt) wird gegenüber der LDL-Lipoproteinfraktion erhalten, so daß das erfindungsgemäße Verfahren zur selektiven Bestimmung von LDL-Triglycerid besonders gut geeignet ist. Gerade eine solche
30 Selektivität zur Bestimmung von Triglycerid aus LDL-Lipoprotein macht die Diagnostik für das hier betreffende Gebiet besonders aussagekräftig.

35

Ein besonderer Vorteil der Erfindung besteht darin, daß die Differenzierung nach Lipoproteinfraktionen aus homogener Lösung erfolgt. Eines speziellen Fraktionierungsschrittes, wie es nach den herkömmlichen, eingangs beschriebenen

Verfahren erforderlich war, ist daher im erfindungsgemäßen Verfahren nicht mehr notwendig. Insbesondere ist kein Fällungsschritt zur Abtrennung bestimmter Lipoproteinfraktionen erforderlich, so daß die Bestimmung von

5 Triglycerid ohne Zentrifugationsschritt erfolgen kann.

Da ferner durch den Einsatz des speziellen nicht-ionischen oberflächenaktiven Mittels eine Trübung der homogenen Lösung vermieden werden kann, ist es möglich, die Triglyceridmenge aus der selektiv solubilisierten Lipoproteinfraktion auf
10 einfache und schnelle Weise direkt zu bestimmen und zu quantifizieren. Dies macht das erfindungsgemäße Verfahren als leicht automatisierbares System besonders gut der Routinediagnostik zugänglich.

15 Als Grundlage für diese vorteilhaften Wirkungen wird vermutet, daß der Einsatz von POP-POE als nicht-ionisches oberflächenaktives Mittel ein selektives Solubilisieren bestimmter Lipoproteinfraktionen ermöglicht, so daß das ursprünglich mit dieser Lipoproteinfraktion assoziierte
20 Triglycerid gegenüber den Bestimmungs- und Nachweisreagentien für Triglycerid zugänglich und reaktiv gemacht wird, wohingegen andere Lipoproteinfraktionen weniger stark bis gar nicht solubilisiert werden und somit das dort enthaltene Triglycerid einer Bestimmung und Quantifizierung nicht
25 zugänglich ist. Die Selektivität gegenüber den einzelnen Lipoproteinfraktionen kann je nach Wunsch über die Zusammensetzung des POP-POE-Block-Copolymeren eingestellt werden. Berücksichtigt man, daß ein derartiges Block-Copolymer aus einem relativ hydrophilen Block A mit Ethylen-
30 oxid-Einheiten und einem relativ hydrophoben Block B mit Propylenoxid-Monomeren aufgebaut sind, lassen sich durch Variation der Blockeinheiten, sowohl innerhalb der jeweiligen Blockeinheit A bzw. B als auch im Verhältnis dieser Einheiten zueinander, bestimmte Block-Copolymere herausbilden, die dann
35 eine gewünschte Selektivität zur Solubilisierung eines spezifischen Lipoproteins oder einer Gruppe zweier Lipoprotein-

klassen erzeugen. Geeignete Einflußgrößen sind hierbei der Polymerisationsgrad bzw. die Polymerisationslänge innerhalb der einzelnen Blockeinheiten A oder B und die Anordnung und Proportionierung der Blockeinheiten zum Gesamtcopolymeren.

- 5 Ein Gesamtüberblick über Block-Copolymere von Propylenoxid und Ethylenoxid, woraus die dann zur Solubilisierung einzelner Lipoproteinfraktionen geeigneten Materialien ausgewählt werden können, ergibt sich aus den Übersichtsartikeln von I.R. Schmolka in J. Am. Oil Chem. Soc. 54, 10 S. 110 (1977), M.A. Plant in R.D. Karsa (Hrg.): "Industrial Applications of Surfactants", The Royal Society of Chemistry, London, S. 318-332 (1986) und K. Kosswig in "Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry", Vol. A 25, S. 747-817, "Surfactants", insbesondere Kapitel 10.1 (1994), wobei 15 letztgenannte Literaturstelle auch eine Liste der in Frage kommenden Hersteller angibt.

Da die diagnostische Aussagekraft durch eine selektive Bestimmung von LDL-assoziiertem Triglycerid besonders gut 20 ist, werden im folgenden die POP-POE-Block-Copolymermaterialien näher beschrieben, die sich durch eine ausgezeichnete Selektivität der Solubilisierung von LDL und der damit zusammenhängenden Zugänglichmachung von LDL-assoziiertem Triglycerid gegenüber Bestimmungs- und Nachweisreagentien 25 auszeichnen.

- Nach dieser bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung besteht das Block-Copolymer aus einem Triblock-Copolymeren A-B-A von Polyoxyethylen-Blöcken A und einem zentralen Polyoxypropylen-Block B. Es hat sich heraus- 30 gestellt, daß sich eine besonders hohe Selektivität zur Bestimmung von LDL-Triglycerid dann ergibt, wenn das Molekulargewicht des POP-POE-Triblockpolymeren A-B-A im Bereich von 1.000 bis 8.000 liegt. Ferner wirkt sich besonders günstig die Beachtung des Verhältnisses aus dem 35 zentralen hydrophoben Blockbestandteil B zu den endständigen hydrophilen Blockbestandteilen A aus. Es wurde festgestellt,

daß die Selektivität zur Solubilisierung von LDL-Triglycerid besonders günstig ist, wenn die molekulare Teilmasse des Polyoxypropylen-Blocks B bezüglich des gesamten Triblock-Copolymeren A-B-A im Bereich von 75 bis 95%, insbesondere von 85 bis 95 % liegt. Es wird angenommen, daß im Falle der Beachtung der vorstehenden Bedingungen das Hydrophilizitäts/Lipophilizitäts-Gleichgewicht (HLB) so eingestellt ist, daß die Struktur in der LDL-Fraktion destabilisiert wird, während die Strukturen in den anderen Lipoproteinfraktionen (HDL, VLDL und CM) relativ stabil bleiben, und somit die dort enthaltenen Triglyceride zur Bestimmung nicht oder zu einem geringeren Ausmaß zur Verfügung stehen. Folglich ergibt sich aus den vorstehend genannten Erkenntnissen, daß mit der mit der Zunahme der molekularen Massenfraktion des POP-Blocks B einhergehenden Hydrophobizität die Selektivität gegenüber LDL-Triglycerid erhöht wird.

Die Menge des POP-POE-Blockcopolymeren in einem zur Umsetzung mit einer Triglycerid-Lipoprotein-haltigen Probe formulierten Reagens liegt geeigneterweise im Bereich von 0,001 bis 10 Gew.-%, vorzugsweise von 0,01 bis 5 Gew.-% und insbesondere von 0.1 bis 1 Gew.-%.

Darüber hinaus wurde festgestellt, daß sich die Selektivität gegenüber einzelnen Lipoproteinfraktionen dadurch steigern läßt, daß im Rahmen des erfindungsgemäßen Verfahrens die Lipoprotein-haltigen Proben ferner mit Mitteln zur Aggregation von Lipoproteinfraktionen umgesetzt werden. Der Grund für diese Selektivitätssteigerung durch Aggregationsmittel wird darin vermutet, daß die Lipoproteinfraktionen, die von dem entsprechend ausgewählten POP-POE-Material weniger stark solubilisiert werden, durch die Aggregation zusätzlich stabilisiert werden.

Beispiele geeigneter Mittel zur Aggregation von Lipoproteinfraktionen schließen Heparin oder dessen Salz, Phosphor-

wolfram-Säure oder deren Salz, Dextran-Schwefelsäure oder deren Salz, Polyethylenglycol, sulfatisiertes Cyclodextrin oder dessen Salz, sulfatisiertes Oligosaccharid oder dessen Salz sowie Mischungen davon ein. Beispiele von Cyclodextrin schließen α -Cyclodextrin, β -Cyclodextrin und γ -Cyclodextrin ein. Beispiele für das Oligosaccharid schließen Maltotriose, Maltotetraose, Maltopentaose, Maltohexaose und Maltoheptaose ein. Als Salze dienen beispielsweise die Natrium-, Kalium-, Lithium-, Ammonium- und Magnesium-Salze.

10

Ein bevorzugtes Aggregationsmittel ist Cyclodextrin oder Cyclodextrin-Derivat. Insbesondere beim Einsatz von sulfatisiertem α -Cyclodextrin hat sich auf vorteilhafte Weise gezeigt, daß die Selektivität hinsichtlich LDL-assoziiertem Triglycerid verbessert wird.

15

Ein weiteres bevorzugtes Aggregationsmittel ist Dextran-Schwefelsäure bzw. dessen Salz Dextransulfat.

Wieder im Hinblick auf die erfindungsgemäß bevorzugte Selektivität gegenüber LDL-Triglycerid wurde gefunden, daß insbesondere eine Kombination von sulfatisiertem α -Cyclodextrin mit Dextransulfat eine gesteigerte Wirkung aufwies.

20

Zur Unterstützung bzw. Stabilisierung der Aggregation der Lipoproteinfractionen, die durch das spezielle POP-POE-oberflächenaktive Mittel nicht spezifisch solubilisiert werden sollen, sollten ferner neben dem Aggregationsmittel

25

Salze von zwei-wertigen Metallionen eingesetzt werden. Beispiele geeigneter 2-wertiger Metallionen sind Magnesium, Mangan, Calcium, Nickel und Cobalt, bevorzugt ist Magnesium.

30

Die Mengen der ggf. einzusetzenden Aggregationsmittel bzw. der Salze zwei-wertiger Metallionen können auf den jeweiligen Fall unter Beachtung der gewünschten Selektivität hinsichtlich einzelner Lipoproteinfractionen sowie der Art des Aggregationsmittels angepaßt werden. Die bevorzugte Gehaltsuntergrenze ist dabei durch einen gewünschten und spürbaren Stabilisierungseffekt festgelegt, während die bevorzugte

35

Gehaltsobergrenze durch die Vermeidung einer Eintrübung und insbesondere die Vermeidung von Präzipitationen festgelegt ist, was eine direkte Triglycerid-Bestimmung aus homogener Lösung verhindern würde.

5

Geeignete Gehaltsmengen der vorstehend genannten Bestandteile in einem entsprechend formulierten Reagens liegen in folgenden Bereichen: 0,02 bis 10 mM Heparin mit einem Molekulargewicht von 5.000 bis 20.000 oder dessen Salz, 0,1 bis 10 mM

10

Phosphorwolfram-Säure mit einem Molekulargewicht von 4.000 bis 8.000 oder dessen Salz, 0,01 bis 5 mM Dextran-Schwefelsäure bei einem Molekulargewicht von 10.000 bis 500.000 oder 0,1 bis 20 mM Dextran-Schwefelsäure bei einem Molekulargewicht von 1.000 bis 10.000 bzw. deren Salze, 0,3 bis 100 mM

15

Polyethylenglycol (PEG) mit einem Molekulargewicht von 4.000 bis 25.000, 0,1 bis 50 mM sulfatisiertes Cyclodextrin mit einem Molekulargewicht von 1.000 bis 3.000 bzw. dessen Salz, 0,1 bis 50 mM sulfatisiertes Oligosaccharid mit einem Molekulargewicht von 400 bis 3.000 oder dessen Salz, sowie

20

Mischungen davon. Bevorzugt sind 0,03 bis 1 mM Heparin mit einem Molekulargewicht von 14.000 bis 16.000 oder dessen Salz, 0,1 bis 3 mM Phosphorwolframsäure mit einem Molekulargewicht von 5.000 bis 7.000 oder dessen Salz, 0,01 bis 5 mM Dextransulfat mit einem Molekulargewicht von 150.000 bis

25

250.000 oder dessen Salz, 0,1 bis 10 mM Dextranschwefelsäure mit einem Molekulargewicht von 1.000 bis 5.000 oder dessen Salz, 1,0 bis 50 mM PEG mit einem Molekulargewicht von 5.000 bis 22.000, 0,1 bis 10 mM sulfatisiertes Cyclodextrin mit einem Molekulargewicht von 1.000 bis 2.000 oder dessen Salz,

30

0,1 bis 10 mM sulfatisiertes Oligosaccharid mit einem Molekulargewicht von 400 bis 2.000 oder dessen Salz, sowie Mischungen davon.

Die Konzentration des Salzes von divalenten Metallionen beträgt geeigneterweise 0,1 bis 50 mM, vorzugsweise 1 bis 5

35

mM.

17.12.97

16

Die weitere Maßnahme b) des erfindungsgemäßen Verfahrens besteht in der Durchführung einer Triglycerid-Bestimmungsmethode. Hierfür können an sich bekannte und beispielsweise die in den eingangs genannten, herkömmlichen Lipoprotein-

5 Triglycerid-Bestimmungsverfahren eingesetzten Bestimmungsmethoden angewandt werden. Dabei wirkt sich der Einsatz der üblicherweise durchgeführten enzymatischen Bestimmungsmethoden für das erfindungsgemäße Konzept vorteilhaft aus. Denn die dafür eingesetzten Enzyme vermögen einerseits das
10 Triglycerid in den spezifisch destabilisierten bzw. solubilisierten Lipoproteinfraktionen zu erreichen und damit zu reagieren (was in erster Linie die enzymatische Spaltung von Triglycerid unter Bildung von Glycerin betrifft), wohingegen die nicht vorrangig solubilisierten und ggf. durch Aggrega-
15 tionsmittel zusätzlich stabilisierten Lipoproteinfraktionen das dort assoziierte Triglycerid vor der enzymatischen Reaktion schützen.

Das enzymatische Spalten erfolgt zweckmäßigerweise mit Hilfe
20 von Lipase oder einer Esterase. Das dadurch freigesetzte Glycerin kann durch enzymatische photometrische Tests und insbesondere mittels Farb-Nachweisreaktionen bestimmt und quantifiziert werden. Ein Überblick über kommerziell erhältliche Tests zur Durchführung der Triglycerid-Bestimmung wird
25 gegeben von A. Bruckner und M. Moret in J. Clin. Chem. Clin. Biochem., Vol. 21, S. 97-106 (1983).

Erfindungsgemäß hat sich eine Bestimmungsmethode als besonders sensitiv erwiesen, die darin besteht, daß das wie
30 zuvor beschrieben freigesetzte Glycerin bestimmt wird durch enzymatische Reaktion mit den Enzymen Glycero-Kinase und Glycerol-3-Phosphat-Dehydrogenase, wodurch ein reduzierter Akzeptor von Reduktions-Oxidations-Äquivalenten, wie NAD oder FMN, gebildet wird, welcher dann seinerseits durch eine
35 Nachweisreaktion bestimmt wird.

Als empfindliche Nachweisreaktion empfiehlt sich die Durchführung einer Farbreaktion, bei der der reduzierte Akzeptor von Reduktions-/Oxidationsäquivalenten wie NADH bzw. FMNH₂ über einen Elektronenkoppler ein Farbstoff reduziert wird,

5 dessen reduzierte Form photometrisch durch die entsprechende Absorptionswellenlänge bestimmt werden kann. Als Elektronenkoppler eignet sich beispielsweise das Enzym Diaphorase oder das synthetische Phenacinnmethosulfat. Beispiele von Farbstoffen sind Tetrazoliumsalze, wie Tetrazolium-Blau, Nitro-
10 blau-Tetrazolium (NBT), Tetrazolium-Violett, Tetrazolium-Purpur und 2-(p-Iodphenyl)-3-(p-nitrophenyl)-5-phenyl Tetrazoliumchlorid (INT). Diese Farbstoffe reagieren unter Formazanbildung zu Farbstoffen, welche bei der entsprechenden Absorptionswellenlänge photometrisch bestimmt und quantifiziert werden können, im Fall von NBT oder INT beispielsweise bei 570 nm.

Andere Beispiele, insbesondere im Hinblick auf eine hohe Sensitivität, schließen fluorometrische und luminometrische Bestimmungen ein.

20

Eine weitere Sensitivitätssteigerung im Zusammenhang mit der Durchführung der Triglycerid-Bestimmungsmethode wird dadurch erhalten, daß die enzymatische Reaktion mit dem freigesetzten Glycerin zusätzlich den Einsatz der Enzyme Triosephosphat-
25 Isomerase und Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase einschließt. Die Sensitivitätssteigerung ergibt sich dadurch, daß pro freigesetztem Molekül Glycerin nicht nur ein, sondern zwei Moleküle reduzierter Reduktions-/Oxidationsäquivalent erzeugt werden. Dadurch stehen entsprechend pro freigesetztem
30 Glycerinmolekül zwei Moleküle reduzierter Reduktions-/Oxidationsäquivalente, wie NADH und FADH, zur Verfügung, was folglich auch die Nachweis-Sensitivität verdoppelt.

35

Ein besonderer Vorteil der Erfindung ergibt sich daraus, daß sowohl die Umsetzung von Triglycerid-haltigem Lipoprotein mit dem speziellen POP-POE oberflächenaktiven Mittel (Maßnahme

a)) als auch die Durchführung der Triglycerid-Bestimmungsmethode (Maßnahme b)) gleichzeitig ablaufen gelassen werden können. Dadurch wird das herkömmlich notwendige zweistufige Verfahren auf ein einstufiges Verfahren reduziert. Ferner sind keine arbeits- und zeitraubenden Fraktionierungsschritte mehr erforderlich; die Inkubation gemäß Maßnahme a) und die Triglycerid-Bestimmung gemäß Maßnahme b) können gleichzeitig oder zumindest zeitlich überlappend in einem Ansatz erfolgen. Wird gemäß der bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung zur Selektivitätssteigerung ein Mittel zur Aggregation von Lipoproteinen und ggf. ferner das Salz von zweiwertigen Metallionen verwendet, so hat es sich jedoch als zweckmäßig erwiesen, zunächst diese Bestandteile mit der zu bestimmenden Probe kurz zu inkubieren (beispielsweise für ein paar Minuten), und erst danach zu diesem Ansatz das spezielle POP-POE oberflächenaktiven Mittel sowie die Reagentien zur Triglycerid-Bestimmung zuzugeben. Nach einer weiteren Inkubationszeit von einigen Minuten kann dann die entsprechende Detektion, beispielsweise die beschriebene photometrische Bestimmung, erfolgen.

Die Inkubation zur selektiven Zugänglichmachung bzw. Freisetzung von Triglycerid aus spezifischen Lipoproteinfraktionen sowie die gleichzeitige bzw. anschließende Durchführung der Triglycerid-Bestimmungsmethode erfolgt in einem geeigneten Puffersystem, welches vorzugsweise einen pH-Bereich von 5 bis 9 und insbesondere von etwa 6,5 bis 9 puffert. Geeignet ist beispielsweise ein Glycylglycin-Puffer oder ein Tris-Puffer in einer Konzentration von 5 bis 500 mM. Für die enzymatischen Reaktionen werden darüber hinaus geeigneterweise ein Donor energiereicher Phosphatgruppen, wie ATP (z.B. 0,1 mM bis 50mM ATP), ein Calciumionen-Chelator wie EDTA (z.B. 0 bis 5 mM EDTA) und Magnesiumsalz wie $MgCl_2$ (z.B. 1 mM bis 50 mM) eingesetzt.

Zur praktischen Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens wird die Triglycerid-assoziierte, Lipoprotein-haltige biologische Probe, die in der Regel aus einer Blutprobe (Serum oder Plasma) oder einer Urinprobe besteht, unter einer
5 angemessenen Verdünnung, die etwa im Bereich von 0,1:100 bis 10:100 und insbesondere im Bereich von 0,5:100 bis 2:100 liegt, mit dem die zuvor beschriebenen Bestandteile enthaltenden Reagens gemischt. Beim bevorzugten Einsatz der Aggregationsmittel und ggf. der zwei-wertigen Metallionen
10 wird zunächst eine Verdünnungsmischung mit dem diese Bestandteile enthaltenden Reagens in der zuvor beschriebenen Weise hergestellt und kurz inkubiert, wonach dann das Reagens mit den für die Maßnahmen a) und b) beschriebenen Mitteln zugegeben wird.

15

Die Erfindung stellt ferner einen zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens besonders angepaßtes Diagnostik-Produkt zur Verfügung, welches - in mindestens einem Reagens des Diagnostik-Produkts - als Bestandteil a) (entsprechend
20 Verfahrensmaßnahme a)) das zuvor beschriebene, spezielle oberflächenaktive Mittel sowie als Bestandteil b) (entsprechend Verfahrensmaßnahme b)) das bzw. die beschriebene(n) Mittel zur Bestimmung von Triglycerid umfaßt. Hinsichtlich der Beschreibung des Bestandteils a) sowie des Bestandteils
25 b) kann auf die obige Beschreibung der entsprechenden Verfahrensmaßnahmen verwiesen werden.

30

Damit in vorteilhafter Weise die Inkubation mit dem oberflächenaktiven Mittel und die Inkubation zur Triglycerid-Bestimmung gleichzeitig ablaufen, ist das Diagnostik-Produkt vorzugsweise als Kit ausgestaltet, und die Bestandteile a) und b) sind dabei in einem Reagens oder zwei Reagenzien des Diagnostik-Kits zusammengefaßt.

35

In einer bevorzugten Ausgestaltung des Diagnostik-Produkts enthält dieses ferner als weiteren Bestandteil Mittel zur

Aggregation von Lipoproteinfraktionen sowie ggf. ein Salz
zwei-wertiger Metallionen. Auch insoweit kann auf die obige
Beschreibung Bezug genommen werden. Das bzw. die Mittel zur
Aggregation und ggf. das Salz zwei-wertiger Metallionen ist
5 bzw. sind vorzugsweise in einem Reagens des Diagnostik-Kits
enthalten, welches von dem die vorstehend genannten
Bestandteile a) und b) umfassenden Reagens verschieden ist.
Dies erlaubt das oben beschriebene, vorteilhafte Vorziehen
der Inkubation der zu bestimmenden Probe mit den stabili-
10 sierenden Aggregationsmitteln, bevor das Umsetzen mit dem
speziellen oberflächenaktiven Mittel und die ggf. gleich-
zeitige Durchführung der Triglycerid-Bestimmung angeschlossen
wird.

15 Die vorliegende Erfindung zeichnet sich durch eine hohe
Selektivität gegenüber Lipoproteinfraktionen in homogener,
flüssiger Phase aus. Dies gilt insbesondere für die selektive
Bestimmung von LDL-Triglycerid unter den oben beschriebenen
Bedingungen.

20 Bei einem Vergleich mit herkömmlichen Bestimmungsverfahren
wurde festgestellt, daß die durch die Erfindung erhaltenen
Ergebnisse sehr gut mit denjenigen des Stands der Technik
korrelieren. Jedoch reicht erfindungsgemäß eine kleine Menge
der zu untersuchenden Probe aus, und das spezifische Lipo-
25 protein-assoziierte Triglycerid kann in kurzer Zeit von
bereits wenigen Minuten bestimmt werden. Ferner kann die
Bestimmung direkt aus der homogenen Phase erfolgen, so daß
zweistufige Prozesse, die aufwendige Fraktionierungsschritte
einschließen, nicht mehr erforderlich sind.

30 Die vorliegende Erfindung eignet sich daher ausgezeichnet für
die einfache und zuverlässige Routinediagnostik und dürfte
leicht einer Automatisierung zugänglich sein. Als diagnosti-
sche Möglichkeit bietet sich in erster Linie der Einsatz des
35 erfindungsgemäßen Verfahrens bzw. Diagnostik-Produkts zur In-
vitro-Diagnose oder Risikoerfassung von Gefäßerkrankungen an.

In diesem Zusammenhang sind insbesondere zu nennen die Erfassung von LDL-Triglyceriden als universeller Risikoindikator für die koronare Herzkrankheit, ferner für die diabetische Makro- und Mikro-Angiopathie und als Indikator für atypisch zusammengesetzte LDL (Typ III Hyperlipoproteinämie nach Fredrickson).

Die Erfindung wird nachstehend anhand folgender Beispiele näher erläutert.

10

Beispiel 1

Zur selektiven Bestimmung von LDL-Triglycerid wurde zunächst ein Reagens mit folgenden Bestandteilen formuliert.

15

POP-POE-Triblock-Copolymer, Molekulargewicht 4.500, POP-Anteil 90 Gew.-%:0,1 Gew.-%

Lipase: 10 kU/l

Glycerokinase: 4,8 kU/l

20

Glycerol-3-Phosphat-Dehydrogenase: 48 kU/l

Triosephosphat-Isomerase: 300 kU/l

Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase: 24 kU/l

Diaphorase: 4,8 kU/l

ATP: 5 mM

25

NAD: 5 mM

EDTA: 0,5 mM

4-NBT: 3 mM

Glycylglycin-Puffer: (pH 7,5): 0,2 M, auf 100 Gew.-% aufgefüllt.

30

Zu 400 µL dieses Reagens wurden 4 µL einer Serumprobe zugegeben und für 5 min bei 37 °C inkubiert. Der sich zu diesem Zeitpunkt gebildete Farbstoff wurde bei 570 nm photometrisch bestimmt.

35

Zur Quantifizierung wurde daneben eine Standardisierungsmessung durchgeführt. Hierfür wurde eine definierte Menge von

durch Ultrazentrifugation isoliertem LDL-Triglycerid vorgegeben (5 g/l) und mit isotonischer Kochsalzlösung (0,9 Gew.-%) in einer festgelegten Verdünnungsreihe bis zu einer Verdünnung von 1:10 verdünnt. Die jeweiligen Verdünnungen

5 wurden analog zur zuvor beschriebenen Vorschrift gemessen. Es ergab sich innerhalb der angelegten Verdünnungsreihe eine lineare Standardkurve.

Ferner wurde zur spezifischen Quantifizierung von LDL-Triglycerid aus der Serumprobe das Gesamt-Triglycerid

10 bestimmt unter Verwendung eines kommerziell erhältlichen Serum-Triglycerid-Tests.

Bei einem Vergleich mit herkömmlichen, zweistufigen Bestimmungsverfahren wie der Ultrazentrifugation und der
15 Präzipitationstechnik ergaben sich ausreichend übereinstimmende Werte durch das erfindungsgemäße Verfahren.

Beispiel 2

20

Beispiel 1 wurde auf die gleiche Weise wiederholt mit der Ausnahme, daß anstelle des dort eingesetzten POP-POE-Block-Copolymeren ein solches mit einer molekularen Teilmasse des POP-Blocks bezüglich des gesamten Block-Copolymeren von
25 70 Gew.-% verwendet wurde.

Das erhaltenen Ergebnis zeigte, daß zwar die Reaktivität der Triglycerid-Bestimmung hinsichtlich der spezifischen LDL-Art ebenso gut war wie im Beispiel 1, daß jedoch eine - wenn auch geringe - Reaktivität gegenüber anderen Lipoprotein-Arten zu
30 beobachten war. Folglich war die Selektivität hinsichtlich der LDL-Triglycerid-Bestimmung zwar immer noch praktisch akzeptabel, jedoch etwas schlechter als im Beispiel 1.

Beispiel 3

Zunächst wurde ein erstes Reagens mit den folgenden Bestandteilen formuliert:

- 5 Sulfatisiertes α -Cyclodextrin: 0,5 mM
- Dextransulfat (Molekulargewicht 200.000): 1 mM
- MgCl₂: 2,5 mM
- Glycylglycin-Puffer (pH 7,2): 0,2 M, auf 100 Gew.-%
aufgefüllt.

10

Zur Durchführung der spezifischen LDL-Triglycerid-Bestimmung wurden 4 μ L der Serumprobe zu 300 μ L dieses Reagens zugegeben, und die Mischung wurde für 5 min bei 37 °C inkubiert. Dann wurden 100 μ L eines zum Beispiel 1 analogen

- 15 Reagens, wobei die Konzentration der Reagensbestandteile außer derjenigen des Puffers viermal höher war, zugesetzt und wieder für 5 min inkubiert. Die Messung des LDL-Triglycerids, der Vergleich zu der Standardkurve und die Gesamt-Serum-triglycerid-Messung erfolgte auf die gleiche Weise wie im
- 20 Beispiel 1 beschrieben.

Die erhaltenen Resultate ergaben eine noch bessere Übereinstimmung mit den herkömmlichen, zweistufigen Triglycerid-Bestimmungsverfahren und somit eine noch bessere
25 Selektivität der LDL-Triglycerid-Bestimmung.



Tiedtke-Bühling-Kinne, POB 20 19 18, D-80019 München

Patentanwälte
Vertreter beim EPA*

Dipl.-Ing. H. Tiedtke*
Dipl.-Chem. G. Bühling*
Dipl.-Ing. R. Kinne*
Dipl.-Ing. B. Pellmann*
Dipl.-Ing. K. Grams*
Dipl.-Biol. Dr. A. Link
Dipl.-Ing. A. Vollnhals*
Dipl.-Ing. T. Leson*
Dipl.-Ing. H. Trösch*
Dipl.-Ing. Dr. G. Chivarov*
Dipl.-Ing. M. Grill*
Dipl.-Ing. A. Kühn

Bavariaring 4,
D-80336 München

17. Dezember 1997

DE 20942

Patentansprüche

1. Verfahren zur Bestimmung von in Lipoprotein enthaltenem Triglycerid mit den folgenden Maßnahmen:

- a) Umsetzen von Triglycerid-haltigem Lipoprotein mit einem nicht-ionischen oberflächenaktiven Mittel, welches aus einem Block-Copolymeren von Propylenoxid und Ethylenoxid aufgebaut ist, und
- b) Durchführen einer Triglycerid-Bestimmungsmethode.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß es zur selektiven Bestimmung von LDL-Triglycerid dient.

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß es in homogener Lösung erfolgt.

4. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß als Block-Copolymer ein A-B-A Triblock-Copolymer von Polyoxyethylen-Blöcken A und zentralem Polyoxypropylen-Block B verwendet wird.

5. Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß zur selektiven Bestimmung von LDL-Triglycerid das

Molekulargewicht des Polyoxypropylen/Polyoxyethylen-Triblock-Copolymeren A-B-A im Bereich von 1000 bis 8000 liegt.

5 6. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß die molekulare Teilmasse des Polyoxypropylen-Blocks B bezüglich des gesamten Triblock-Copolymeren A-B-A im Bereich von 75 bis 95 Gew.-% liegt.

10 7. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Umsetzung gemäß Maßnahme a) und die Triglycerid-Bestimmung gemäß Maßnahme b) gleichzeitig erfolgen.

15 8. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Triglycerid-haltigen Lipoproteine ferner mit Mitteln zur Aggregation von Lipoproteinfraktionen umgesetzt werden.

20 9. Verfahren nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß als Mittel zur Aggregation von Lipoproteinfraktionen Cyclodextrin oder Cyclodextrin-Derivat verwendet wird.

10. Verfahren nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß sulfatisiertes α -Cyclodextrin verwendet wird.

25 11. Verfahren nach einem der Ansprüche 8 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß - ggf. zusätzlich - Dextran-Schwefelsäure bzw. dessen Salz als Mittel zur Aggregation von Lipoproteinfraktionen verwendet wird.

30 12. Verfahren nach einem der Ansprüche 8 bis 11, dadurch gekennzeichnet, daß die Umsetzung mit dem Aggregationsmittel in Gegenwart von zwei-wertigen Metallionen erfolgt.

13. Verfahren nach einem der Ansprüche 8 bis 12, dadurch gekennzeichnet, daß die Umsetzung mit dem Aggregationsmittel vor den Maßnahmen a) und b) erfolgt.

5 14. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Bestimmung von Triglycerid gemäß Maßnahme b) das enzymatische Spalten von Triglycerid und das Bestimmen des dadurch freigesetzten Glycerins umfaßt.

10 15. Verfahren nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, daß das enzymatische Spalten mithilfe von Lipase oder einer Esterase erfolgt.

15 16. Verfahren nach Anspruch 14 oder 15, dadurch gekennzeichnet, daß das freigesetzte Glycerin bestimmt wird durch enzymatische Reaktion mit den Enzymen Glycerol-Kinase und Glycerol-3-Phosphat-Dehydrogenase, wodurch ein reduzierter Akzeptor von Reduktions-/Oxidationsäquivalenten gebildet wird, welcher durch eine Nachweisreaktion bestimmt
20 wird.

25 17. Verfahren nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, daß der enzymatischen Reaktion ferner die Enzyme Triosephosphat-Isomerase und Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase zugesetzt wird.

18. Diagnostik-Produkt zur Bestimmung von in Lipoprotein enthaltenem Triglycerid mit folgenden Bestandteilen:

30 a) ein nicht-ionisches oberflächenaktives Mittel, welches aus einem Block-Copolymeren von Propylenoxid und Ethylenoxid aufgebaut ist, und

b) Mittel zur Bestimmung von Triglycerid.

35 19. Diagnostik-Produkt nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, daß es zur selektiven Bestimmung von LDL-Triglycerid dient.

20. Diagnostik-Produkt nach Anspruch 18 oder 19, dadurch gekennzeichnet, daß der Bestandteil a) als Block-Copolymer ein A-B-A Triblock-Copolymer von Polyoxyethylen-Blöcken A und zentralem Polyoxypropylen-Block enthält.

21. Diagnostik-Produkt nach Anspruch 20, dadurch gekennzeichnet, daß zur selektiven Bestimmung von LDL-Triglycerid das Molekulargewicht des Polyoxypropylen/Polyoxyethylen-Triblock-Copolymeren A-B-A im Bereich von 1000 bis 8000 liegt.

22. Diagnostik-Produkt nach Anspruch 21, dadurch gekennzeichnet, daß die molekulare Teilmasse des Polyoxypropylen-Blocks B bezüglich des gesamten Triblock-Copolymeren A-B-A im Bereich von 75% bis 95 Gew.-% liegt.

23. Diagnostik-Produkt nach einem der Ansprüche 18 bis 22, dadurch gekennzeichnet, daß die Bestandteile a) und b) in einem Reagens eines Diagnostik-Kits zusammengefaßt sind.

24. Diagnostik-Produkt nach einem der Ansprüche 18 bis 23, dadurch gekennzeichnet, daß es als weiteren Bestandteil Mittel zur Aggregation von Lipoproteinfraktionen enthält.

25. Diagnostik-Produkt nach Anspruch 24, dadurch gekennzeichnet, daß als Mittel zur Aggregation von Lipoproteinfraktionen Cyclodextrin oder Cyclodextrin-Derivat enthalten ist.

26. Diagnostik-Produkt nach Anspruch 25, dadurch gekennzeichnet, daß sulfatisiertes α -Cyclodextrin enthalten ist.

27. Diagnostik-Produkt nach einem der Ansprüche 24 bis 26, dadurch gekennzeichnet, daß - ggf. zusätzlich - Dextran-

Schwefelsäure bzw. dessen Salz als Mittel zur Aggregation von Lipoproteinfraktionen enthalten ist.

28. Diagnostik-Produkt nach einem der Ansprüche 24 bis 27, dadurch gekennzeichnet, daß zusätzlich zu dem Mittel zur Aggregation von Lipoproteinfraktionen zwei-wertige Metallionen enthalten sind.

29. Diagnostik-Produkt nach einem der Ansprüche 24 bis 28, dadurch gekennzeichnet, daß der das bzw. die Aggregationsmittel und ggf. die zwei-wertigen Metallionen enthaltende Bestandteil in einem von dem die Bestandteile a) und b) enthaltenden Reagens verschiedenen Reagens eines Diagnostik-Kits enthalten ist.

30. Diagnostik-Produkt nach einem der Ansprüche 18 bis 29, dadurch gekennzeichnet, daß der Bestandteil b) ein Enzym zum Spalten von Triglycerid sowie übliche Mittel zum Bestimmen von Glycerin umfaßt.

31. Diagnostik-Produkt nach Anspruch 30, dadurch gekennzeichnet, daß das Enzym zum Spalten von Triglycerid Lipase oder eine Esterase ist.

32. Diagnostik-Produkt nach Anspruch 30 oder 31, dadurch gekennzeichnet, daß das Mittel zur Bestimmung von abgespaltenem Glycerin die Enzyme Glycero-Kinase und Glycerol-3-Phosphat-Dehydrogenase sowie einen reduzierten Akzeptor von Reduktions-/Oxidationsäquivalenten umfaßt.

33. Diagnostik-Produkt nach Anspruch 32, dadurch gekennzeichnet, daß das Mittel zur Bestimmung von Glycerin ferner die Enzyme Triosephosphat-Isomerase und Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase umfaßt.

34. Verwendung eines Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 17 oder eines Diagnostik-Produkts nach einem der Ansprüche 18 bis 33 zur In-vitro-Diagnose oder Risikoerfassung von Gefäßerkrankungen.



Tiedtke-Bühling-Kinne, POB 20 19 18, D-80019 München

**Patentanwälte
Vertreter beim EPA***

Dipl.-Ing. H. Tiedtke*
Dipl.-Chem. G. Bühling*
Dipl.-Ing. R. Kinne*
Dipl.-Ing. B. Pellmann*
Dipl.-Ing. K. Grams*
Dipl.-Biol. Dr. A. Link*
Dipl.-Ing. A. Vollnhals*
Dipl.-Ing. T. Leson*
Dipl.-Ing. H. Trösch*
Dipl.-Ing. Dr. G. Chivarov*
Dipl.-Ing. M. Grill*
Dipl.-Ing. A. Kühn

**Bavariaring 4,
D-80336 München**

5

10

17. Dezember 1997

DE 20942

Zusammenfassung

15 Beschrieben wird ein Verfahren zur Bestimmung von in
Lipoprotein enthaltenem Triglycerid mit den Maßnahmen, daß
Triglycerid-haltiges Lipoprotein mit einem nicht-ionischen
oberflächenaktiven Mittel, welches aus einem Block-
Copolymeren von Propylenoxid und Ethylenoxid aufgebaut ist,
20 umgesetzt wird, und daß eine Triglycerid-Bestimmungsmethode
durchgeführt wird. In einem Diagnostik-Produkt sind die
Mittel für die vorstehend genannten Verfahrensschritte als
Bestandteile zusammengefaßt. Das Verfahren und das
Diagnostik-Produkt eignen sich besonders zur In-vitro-
25 Diagnose von Gefäßerkrankungen, insbesondere bei der
Erfassung der koronaren Herzkrankheit.

30